

PEMBUATAN DAN STANDARISASI ANTIGEN AI H5N1 KOMERSIAL UNTUK MONITORING TITER ANTIBODI HASIL VAKSINASI AI DI INDUSTRI PETERNAKAN AYAM

(PREPARATION AND STANDARDIZATION OF A COMMERCIAL H5N1 AI ANTIGEN FOR MONITORING ANTIBODY TITER AI VACCINATION RESULTS IN POULTRY INDUSTRY)

Retno D. Soejoedono^{1,*}, Sri Murtini¹, Kamalludin Zarkasie²)

ABSTRACT

Vaccination is one of the chosen strategy for controlling AI H5N1 in Indonesia. Vaccination able to induce protective antibodies against AI but unable to inhibit viral infection. Determination of antibody titers in the serum from bird vaccinated with AI-H5N1 vaccine consisting of 2 or 3 different AI virus isolates difficult to be measured if the antigen for HI test is uncalibrated yet. Furthermore, the determination of a minimum protective antibody titer against the challenge of AI virus circulating in the field at this time needs to be done. This study aims to determine the H5N1 AI virus antigen for standart HI test and the minimum titre of antibodies that able neutralize virus infection. As much as 55 chickens were divided into 11 groups, 10 groups vaccinated with commercial AI vaccine and AI H5N1 field isolat antigen. Four types of commercial vaccines were veccinated to one group and seven other groups vaccinated with the antigen AI Legok 2004, Nagrak Ag 2009, Ag Lawang 2010, as well as polyvalent Ag combination of these three types of antigen. After third vaccinations, the presence of antibodies were measured by HI test. Serum with a titer test 2^6 - 2^8 were tested for the capability of virus neutralization using virus neutralization test against three different H5N1 AI virus field isolates. The test results showed that the H5N1 subtype AI virus antigen representative as standart antigen for HI test is antigen Legok 2004 and the minimum titer which able neutralize H5N1 AI virus field isolates 2^8 .

Keywords: H5N1 , HI test, Serum Netralisation test.

ABSTRAK

Vaksinasi adalah strategi yang dipilih pemerintah sebagai salah satu cara pengendalian AI di Indonesia. Vaksinasi mampu menginduksi antibodi protektif terhadap virus AI namun tidak dapat menghambat infeksi virus AI. Penentuan titer antibodi di dalam serum hasil vaksinasi menggunakan vaksin AI –H5N1 yang terdiri atas 2 atau 3 isolat virus AI yang berbeda sulit dimaknai apabila antigen yang digunakan dalam uji HI belum dikalibrasi antigenitasnya terhadap beberapa isolat virus yang beredar saat ini. Selanjutnya penentuan titer antibodi protektif minimal terhadap tantangan virus AI yang beredar di lapangan pada saat ini perlu dilakukan sehingga diketahui antibodi protektif yang dapat menghambat infeksi virus AI. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan antigen virus AI sub tipe H5N1 yang representatif digunakan pada uji HI dan titer antibodi minimal yang dapat menahan infeksi virus AI H5N1 isolat lapang. Sebanyak 55 ekor ayam dibagi dalam 11 kelompok, 10 kelompok divaksin dengan vaksin AI komersial. Empat jenis vaksin komersial di vaksinasi masing-masing pada satu kelompok dan tujuh kelompok lainnya divaksin dengan antigen AI Legok 2004 ,Ag Nagrak 2009, Ag Lawang 2010, serta Ag polivalen kombinasi diantara ketiga jenis antigen tersebut. Setelah tiga kali vaksinasi serum diperiksa keberadaan antibodinya dengan uji HI. Serum dengan titer 2^6 - 2^8 di uji kemampuannya dalam menetralsasi virus AI H5 N1 galur asal lapang menggunakan uji serum netralisasi. Hasil pengujian menunjukkan bahwa Antigen virus AI sub tipe H5N1 yang representatif digunakan pada uji HI adalah antigen Legok 2004. Titer antibodi minimal yang dapat menahan virus AI H5N1 isolat lapang menggunakan uji serum netralisasi adalah 2^8 .

Kata kunci: Antigen AI H5N1, uji HI, uji Serum netralisasi.

¹) Dep. Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.

Jl. Agatis, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

²) PT Shigeta, Institut Pertanian Bogor.

Jl. Agatis, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

* Penulis korespondensi: 08129554242,
retnod@ipb.ac.id

PENDAHULUAN

Vaksinasi adalah strategi yang dipilih pemerintah sebagai salah satu cara pengendalian AI di Indonesia [DITJENNAK 2007; 2008) vaksinasi mampu menginduksi antibodi protektif terhadap virus AI penantang yang homolog (Capua dan Marangon,

2007; Nugroho *et al.* 2010; Okti *et al.* 2011). Perubahan virus AI sejak tahun 2003 hingga tahun 2011 mengarah kepada perubahan sifat biologis yang sangat nyata (Susanti *et al.* 2008), sehingga vaksin AI yang beredar secara komersial di Indonesia telah dibuat dalam bentuk "*cocktail*" atau polivalen. Sampai saat ini Fakultas Kedokteran Hewan IPB bekerja sama dengan IPB-Shigeta telah berhasil mengumpulkan beberapa isolat AI H5N1 dari lapangan antara lain dari Nagrak 2009 Sukabumi Jawa Barat dan dari Lawang 2010, Malang Jawa Timur. Karakterisasi kedua isolat tersebut telah dilakukan secara molekuler dan biologis kedua isolat tersebut menunjukkan karakter yang berbeda dengan isolat virus AI-H5N1 Legok/2004 (Wibawan dan Karuni, 2010). Penentuan titer antibodi di dalam serum akibat vaksinasi menggunakan vaksin AI-H5N1 yang terdiri dari 2 atau 3 isolat virus AI yang berbeda sulit dimaknai apabila antigen yang digunakan dalam uji HI belum dikalibrasi antigenisitasnya terhadap beberapa isolat virus yang beredar saat ini. Kalibrasi antigenisitas beberapa antigen virus AI sangat penting dan harus dilakukan untuk dapat memaknai gambaran titer antibodi di dalam serum dari kelompok ayam yang terdapat di dalam kandang. Selanjutnya penentuan titer antibodi protektif minimal terhadap tantangan virus AI yang beredar di lapangan pada saat ini perlu dilakukan menggunakan uji serum netralisasi (*SN-Test*). Nilai ini digunakan sebagai dasar untuk melakukan evaluasi dan monitoring keberhasilan vaksinasi.

Tujuan penelitian ini adalah: 1) menentukan antigen virus AI H5N1 yang representatif untuk digunakan dalam uji HI yang terkalibrasi antigenisitasnya terhadap isolat virus AI H5N1 lainnya. 2) menentukan titer antibodi protektif minimal yang mampu menahan tantangan virus AI H5N1 lapang yang beredar saat ini menggunakan *SN-test*.

METODE PENELITIAN

Pada tahap awal penelitian ini diperlukan kandang ayam untuk 55 ekor ayam petelur jenis Isa Brown, yang dibagi dalam 5 kelompok ayam termasuk untuk ayam kontrol. Ayam petelur sudah siap untuk bertelur dan berumur 23 minggu.

- Sebelumnya kandang ayam tersebut dilakukan desinfeksi kandang dengan menggunakan Formalin dan Kalium permanganat.
- Setelah itu kandang dikosongkan selama kurang lebih 3 minggu, sambil menunggu kedatangan ayam petelur

- Pemesanan telur tertunas umur 9 hari (***Clean-egg***)
- Jumlah mahasiswa yang terlibat 1 orang mahasiswa S2.

Disain Penelitian:

A. Uji Hemaglutinasi dan uji Hemaglutinasi Hambatan

Uji Haemaglutinasi (*HA Test*) dengan teknik mikro.

Prosedur:

Duapuluh lima 25 µl NaCl fisiologis steril atau PBS steril pH 7,4 diisikan dalam *microwell* (mikroplat) lubang pertama sampai 12 menggunakan mikropipet 25 µl. Dengan mikropipet 25 µl diambil 25 µl suspensi virus AI atau antigen AI H5N1 dan di masukkan kedalam lubang atau sumur pertama.

Dengan mikropipet 25 µl lakukan pencampuran suspensi virus dengan NaCl pada lubang atau sumur pertama dengan cara menghisap dan meneteskan cairan tersebut, lakukan cara ini paling tidak lima kali.

Duapuluh lima µl dari lubang pertama kemudian pindahkan kelubang kedua dan lakukan pencampuran seperti no. 3. Selanjutnya dipindahkan 25 µl ke lubang 3, begitu seterusnya sampai lubang ke 11. Dari lubang ke-11 diambil 25 µl dan dibuang. Pada lubang atau sumur ke 12 sebagai kontrol negatif hanya berisi NaCl fisiologis saja. Penambahan 100 µl suspensi sel darah merah 1% ke dalam seluruh lubang. Dihomogenkan dengan cara menggoyangkan *microwell* (mikroplat).

Pembacaan hasil:

Pembacaan hasil uji dapat dilakukan apabila sel darah merah 1% pada lubang atau sumur kontrol telah mengendap ke dasar lubang. Lubang no. 12 tidak terjadi aglutinasi. Hasil dikatakan positif bila terjadi aglutinasi yang komplit dari sel darah merah, yang terlihat bentuk kasar seperti pasir pada pinggir dasar lubang. Batas nilai dari titrasi adalah pengenceran tertinggi dari antigen yang masih menghasilkan aglutinasi komplit.

Prosedur uji HA karena menggunakan mikroplat dasar V maka untuk pembacaan di mikroplat bila aglutinasi berbentuk pasir sedang bila mengendap berbentuk airmata menetes (TEARS).

B. Uji Hemaglutinasi Hambatan

Prosedur (HI Test mikro titrasi):

Duapuluh lima µl NaCl fisiologis atau PBS pada lubang diisikan pada lubang 1 sampai 12 menggunakan mikropipet 25 µl Dengan mikropipet 25 µl ambil 25 µl suspensi virus AI H5N1 dan masukkan kedalam lubang atau sumur pertama. Setelah itu

diambil 25 µl serum kebal AI dan dimasukkan kedalam lubang pertama. Selanjutnya dilakukan pencampuran suspensi virus dengan NaCl pada lubang pertama dengan cara menghisap dan menetes cairan tersebut, lakukan cara ini paling tidak lima kali.

Duapuluh lima µl diambil dari lubang pertama kemudian pindahkan ke lubang kedua dan lakukan pencampuran seperti no. 3. Selanjutnya pindahkan 25 µl ke lubang 3, begitu seterusnya sampai lubang ke 10. Dari lubang atau sumur ke-10 diambil 25 µl dan dibuang. Pada lubang ke 11 sebagai kontrol serum jadi hanya berisi NaCl fisiologis atau PBS dan serum saja serta lubang 12 sebagai kontrol virus : yang berisi NaCl fisiologis atau PBS dan virus.

Penambahkan 25 µl virus standar 4 HAU kedalam semua lubang, kecuali lubang ke-11 kemudian diinkubasikan selama 15 menit. Setelah inkubasi tambahkan 100 ul suspensi sel darah merah 1% ke dalam seluruh lubang mikropelat. Homogenkan suspensi dalam lubang dengan menggoyang-goyangkan mikropelat kemudian diinkubasikan pada suhu ruang selama 30-60 menit, kemudian dibaca hasilnya.

Pembacaan hasil:

Pembacaan hasil uji dapat dilakukan apabila sel darah merah 1% atau eritrosit pada lubang kontrol telah mengendap ke dasar lubang atau sumur. Lubang no. 11 tidak terjadi aglutinasi sedangkan pada lubang 12 terjadi aglutinasi. Hasil dikatakan positif bila tidak terjadi aglutinasi sel darah merah, yang terlihat bentuk tetes air mata dilubang. Batas nilai dari titrasi adalah pengenceran tertinggi dari antibodi yang masih dapat menghambat aglutinasi dikalikan titer virus standarnya.

C. Uji Netralisasi

Prosedur:

Metode Netralisasi α (alpha)

Pada metode ini menggunakan serum yang tidak diencerkan (konstan) sedangkan pada virus dilakukan pengenceran. Biasanya menggunakan serum standar.

Sistem indikator telur tertunas.

- Kedalam rak diletakan tabung reaksi (ukuran 3 ml) sebanyak 12 tabung
- Pada tabung 1-8 diisi pelarut (Na Cl fisiologis) 1,8 ml .
- Tabung 1 diisi dengan 0,2 ml virus, kemudian lakukan pengenceran seri Pindahkan 0,5 ml virus setiap pengenceran ke rak lubang atau sumur 2 dan 3I sesuai dengan nomor urut tabung reaksi.

- Biarkan pada suhu 37°C selama 30 menit atau suhu kamar 40 menit.
- Suntikan masing-masing pengenceran (0,2 ml) pada 3 butir telur tertunas, kemudian diamati setiap hari sampai hari ke-4.

Pelarut yang digunakan untuk pengenceran virus, sebelumnya ditambahkan campuran 10.000 Penisilin IU dan Streptomisin (ug) per ml pelarut.

Pemupukan pada Telur Tertunas

Prosedur:

- Dalam rak diletakan tabung reaksi (ukuran 3 ml) sebanyak 12 tabung rak I, dimasukan serum X sebanyak 0,2 ml dan pelarut sebanyak 1,8 ml kemudian dihomogenkan.
- Pengenceran seri dengan mengambil 0,2 ml dari tabung reaksi satu dan dimasukan ke tabung reaksi 2, dan seterusnya.
- Tabung reaksi rak II, lakukan pengenceran serum positif (10^{-1} , 10^{-2} ,...dst).
- Tabung reaksi rak III berisi 0,5 ml virus A (kontrol).
- Pindahkan sebanyak 0,2 ml virus A ke tabung reaksi I dan 0,2 ml ke tabung rak II sesuai dengan nomor urut tabung reaksi.
- Biarkan pada suhu kamar, 30-40 menit.
- Nol koma dua (0,2 ml) dari setiap pengenceran suspensi dari rak I dan II diinokulasikan kemasing-masing 3 butir telur.

Tahap Proses Pelaksanaan Penelitian:

Hasil titrasi ayam sebelum divaksinasi adalah $2^{3,60}$

Setelah ayam petelur diistirahatkan selama 2 (dua) hari dilakukan penyuntikan antigen AI dengan jadwal sebagai berikut:

Penyuntikan pertama, semua vaksin dalam bentuk inaktif

1. Vaksin C (V-C) dosis 0,3 ml subkutan pada 5 ekor ayam,
2. Vaksin S (V-S) dosis 0,5 ml subkutan pada 5 ekor ayam
3. Vaksin M (V-M) dosis 0,5 ml subkutan pada 5 ekor ayam
4. Vaksin V (V-V) dosis 0,5 ml subkutan pada 5 ekor ayam
 - Ag AI Legok 2004 pada 5 ekor intravena 0,2 ml (1024 HAU)
 - Ag Nagrak 2009, dosis 0,2 ml (1024 HAU) intravena
 - Ag Lawang 2010, dosis 0,05 ml (104 HAU), intravena dan

- Ag polivalen (Legok 2004, Nagrak 2009 dan Lawang 2010) dosis 0,5 ml, adjuvant, subkutan masing masing disuntikan pada 5 ekor ayam
 - Ag polivalen (Legok 2004, Lawang 2010) dosis 0,5 ml, adjuvant, subkutan masing masing disuntikan pada 5 ekor ayam
 - Ag polivalen (Legok 2004 dan Nagrak 2009) dosis 0,5 ml, adjuvant, subkutan masing masing disuntikan pada 5 ekor ayam
 - Ag polivalen (Lawang 2010 dan Nagrak 2009) dosis 0,5 ml, adjuvant, subkutan masing masing disuntikan pada 5 ekor ayam
5. Penyuntikan kedua dengan selang 3-4 minggu
 6. Penyuntikan ketiga dengan selang 3-4 minggu.
 7. Pengambilan serum darah ayam 4 minggu setelah penyuntikan terakhir

Setelah penyuntikan terakhir maka masing-masing kelompok ayam diambil darahnya untuk dilakukan uji HI terhadap antigen subtype Legok 2004, Nagrak 2009 dan Lawang 2010, dan Pusvetma 2010.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini vaksinasi dengan menggunakan vaksin V-M, V-C, V-V, V-S, Legok 2004, Nagrak 2009, Lawang 2010 dan vaksin polivalen kecuali yang mengandung antigen Lawang 2010 bila terpapar dengan virus Legok akan menghasilkan titer antibodi protektif dibandingkan dengan virus selain Legok 2004 (Tabel 1).

Tabel 1 Hasil uji Hemaglutinasi

Serum Kebal Ayam	Antigen AI H5N1			
	Legok 2004	Nagrak 2009	Lawang 2010	Pusvetma 2010
V-M	7,80	7,80	6,80	6,40
V-C	7,40	7,60	6,20	6,00
V-V	8,00	8,00	7,40	5,60
V-S	8,00	5,60	6,60	5,80
Legok 2004	8,00	7,80	4,80	4,80
Nagrak 2009	7,20	7,60	6,60	5,80
Lawang 2010	7,80	5,40	8,00	5,00
Legok 04 + Nagrak 09	8,00	8,00	6,30	2,40
Nagrak 09 + Lawang 10	1,30	4,67	8,00	5,30
Legok 04 + Lawang 10	8,00	7,30	8,00	3,67
Legok 04 + Nagrak 09 + Lawang 10	4,00	8,00	6,60	5,80

Sedangkan hasil pengamatan dari uji kalibrasi (Tabel 2) menyatakan bahwa bila vaksin AI H5N1 yang digunakan berasal dari Legok 2004, Nagrak 2009 dan Lawang 2010 maka bila paparan lapang dengan virus lapang ke 3 ternyata masih menghasilkan kekebalan yang cukup protektif.

Kemudian dilanjutkan dengan uji netralisasi pada telur tertunas umur 9-10 hari. Yang diawali dengan titrasi antigen untuk digunakan pada uji netralisasi serum ayam yang diambil dari kelompok ayam yang masing-masing divaksinasi dengan vaksin komersial (V-S, V-V, V-C, V-M). Setelah ayam divaksinasi ke tiga, dengan selang waktu 4 minggu maka diambil serum yang mengandung antibodi terhadap masing-masing vaksin komersial.

Pengamatan pada kelompok ayam yang masing-masing divaksinasi dengan vaksin komersial kode V-S ; V-V ; V-C dan V-M, dan hasil vaksinasi I bila dilakukan uji HI dengan menggunakan Ag Lawang didapatkan nilai titer Ab masing-masing sebesar $2^{1,0}$; $2^{0,8}$; 2^0 , dan 2^0 yang dapat diasumsikan bila terkena paparan lapang maka ayam tsb tidak dapat menahan infeksi karena Ab ayam dengan paparan virus isolat lapang berbeda. Vaksinasi ke 2 didapatkan nilai titer Ab masing-masing sebesar $2^{4,8}$; $2^{4,8}$; $2^{7,8}$, dan 2^0 yang artinya bila terkena paparan lapang maka ayam kelompok yang divaksinasi dengan V-M tsb tidak dapat menahan infeksi karena Ab ayam dengan paparan virus isolat lapang sedangkan kelompok sisanya mampu menahan infeksi lapang dengan konsentrasi titer virus cukup protektif dengan nilai titer $Ab \geq 2^{4,8}$ (menurut FOHI, 2008). Dan hasil

Tabel 2 Hasil kalibrasi dengan uji HA-HI

Serum Kebal Ayam	Antigen AI-H5N1		
	Legok 2004	Nagrak 2009	Lawang 2010
Legok 2004	8,0	7,8	4,8
Nagrak 2009	7,2	7,6	3,8
Lawang 2010	7,8	5,4	8,0

Tabel 3 Titer antibodi ayam yang divaksinasi dengan vaksin komersial terhadap antigen Lawang 2010 (Uji Hemaglutinasi)

Vaksin Komersial	Titer Antibodi		
	Vaksinasi I	Vaksinasi II	Vaksinasi III
V-S	$2^{1,0}$	$2^{4,8}$	$2^{6,6}$
V-V	$2^{0,8}$	$2^{4,8}$	$2^{7,4}$
V-C	2^0	$2^{7,8}$	$2^{6,2}$
V-M	2^0	2^0	$2^{6,8}$

vaksinasi ke 3 menunjukkan titer Ab cukup protektif dengan nilai titer Ab $\geq 2^{4,8}$ sehingga vaksinasi dengan empat (4) vaksin komersial pada hanya dengan vaksinasi ke 2 ayam masih protektif namun tidak dengan V-M sehingga dapat disarankan dengan vaksin komersial minimal dilakukan ulangan (*booster*) sebanyak 3 kali ulangan.

Pengamatan pada kelompok ayam (Tabel 4) yang masing-masing divaksinasi dengan vaksin komersial kode V-S; V-V; V-C dan V-M, dan hasil vaksinasi I bila dilakukan uji HI dengan menggunakan Ag Legok 2004 didapatkan nilai titer Ab masing-masing sebesar $2^{7,0}$; $2^{2,6}$; 2^0 , dan $2^{2,9}$ yang dapat diasumsikan bila terkena paparan lapang virus legok maka ayam yang divaksinasi pertama dengan V-Sh dapat menahan infeksi tidak dengan vaksin komersial lainnya. Vaksinasi ke 2 didapatkan nilai titer Ab masing-masing sebesar $2^{4,8}$; $2^{2,6}$; $2^{0,0}$, dan $2^{2,8}$ yang artinya bila terkena paparan lapang maka ayam kelompok yang divaksinasi dengan V-V; VC dan V-M tsb tidak dapat menahan infeksi paparan virus isolat lapang karena titer Ab yang dihasilkan $\leq 2^{2,8}$ sedangkan kelompok sisanya mampu menahan infeksi lapang dengan konsentrasi titer antibodi cukup protektif dengan nilai titer Ab $\geq 2^{4,0}$ (menurut FOHI, 2008). Dan hasil vaksinasi ke 3 menunjukkan titer Ab cukup protektif dengan nilai titer Ab $\geq 2^{6,2}$ sehingga vaksinasi dengan empat (4) vaksin komersial disarankan minimal dilakukan ulangan sebanyak 3 kali.

Pengamatan pada kelompok ayam (Tabel 5) yang masing-masing divaksinasi dengan vaksin komersial kode V-S; V-V; V-C, dan V-M; dan hasil vaksinasi I bila dilakukan uji HI dengan menggunakan Ag Nagrak didapatkan nilai titer Ab masing-masing sebesar $2^{4,8}$; $2^{2,8}$; $2^{4,8}$, dan $2^{2,8}$ yang dapat dikatakan bila terkena paparan lapang virus Nagrak maka ayam yang divaksinasi pertama dengan V-S dan V-C dapat menahan infeksi namun tidak dengan vaksin komersial lainnya. Vaksinasi ke 2 didapatkan nilai titer Ab masing-masing sebesar $2^{2,2}$; $2^{4,4}$; $2^{2,2}$, dan $2^{4,4}$ yang artinya bila terkena paparan lapang maka ayam kelompok yang

divaksinasi dengan V-S; V-C tsb tidak dapat menahan infeksi paparan virus isolat lapang karena titer Ab yang dihasilkan $\leq 2^{2,2}$ sedangkan kelompok sisanya mampu menahan infeksi lapang dengan konsentrasi titer virus cukup protektif dengan nilai titer Ab $\geq 2^{4,9}$ (menurut FOHI, 2008). Dan hasil vaksinasi ke 3 menunjukkan titer Ab cukup protektif dengan nilai titer Ab $\geq 2^{8,0}$ sehingga vaksinasi dengan empat (4) vaksin komersial disarankan minimal dilakukan ulangan sebanyak 3 kali.

Pengamatan yang didapat dari indeks netralisasi untuk untuk vaksin V-M yang menunjukkan bahwa bila paparan lapang dengan virus asal Lawang maka kelompok ayam yang mendapatkan vaksin V-M akan mampu menahan infeksi; hal ini ditunjukkan bahwa hasil indeks netralisasi $> 1.50-1,90$, sedangkan vaksin V-S, V-V dan V-C tidak protektif.

Pada titer antibodi (uji HI) dengan menggunakan antigen Nagrak 2009 terhadap serum ayam yang divaksinasi vaksin V-V (2^7), vaksin V-M (2^7), vaksin V-C (2^0) dan vaksin V-S (2^0). Sehingga didapat indeks netralisasi untuk vaksin V-M, V-S, V-V, dan V-C yang menunjukkan bahwa bila paparan lapang dengan virus asal Nagrak 2009 maka kelompok ayam yang mendapatkan masing-masing vaksin V-M, V-S, V-V, dan V-C akan mampu menahan infeksi. Hal ini ditunjukkan bahwa hasil indeks netralisasi $> 1.50-1,90$, sehingga bersifat protektif.

Tabel 4 Titer antibodi ayam yang divaksinasi dengan vaksin komersial terhadap antigen Legok 2004 (Uji Hemaglutinasi)

Vaksin Komersial	Titer Antibodi		
	Vaksinasi I	Vaksinasi II	Vaksinasi III
V-S	$2^{7,0}$	$2^{4,8}$	$2^{5,6}$
V-V	$2^{2,6}$	$2^{2,6}$	$2^{8,0}$
V-C	2^0	2^0	$2^{7,4}$
V-M	$2^{2,8}$	$2^{2,8}$	$2^{7,8}$

Tabel 6 Hasil uji Netralisasi dengan antigen Lawang 2010

50% endpoint neutralization index	Indeks Netralisasi = (50% endpoint neutralization index Serum normal – Serum sampel)
Serum normal $10^{3,7}$	
Serum terhadap:	
V-M = $10^{1,5}$	V-M = $3,70-1,50 = 2,20$
V-S = $10^{3,25}$	V-S = $3,70-3,25 = 0,45$
V-V = $10^{4,6}$	V-V = $3,70-4,60 = -0,90$
V-C = $10^{3,5}$	V-C = $3,70-3,50 = 0,20$

Tabel 5 Titer antibodi ayam yang divaksinasi dengan vaksin komersial terhadap antigen Nagrak 2009 (Uji Hemaglutinasi)

Vaksin Komersial	Titer Antibodi		
	Vaksinasi I	Vaksinasi II	Vaksinasi III
V-S	$2^{4,8}$	$2^{2,2}$	2^8
V-V	$2^{2,8}$	$2^{4,4}$	2^8
V-C	$2^{4,8}$	$2^{2,2}$	2^8
V-M	$2^{2,8}$	$2^{4,4}$	2^8

Pada titer antibodi (uji HI) dengan menggunakan antigen Nagrak 2004 terhadap serum ayam yang divaksinasi vaksin V-V (2^5), vaksin V-M (2^7), vaksin V-C (2^7) dan vaksin V-S (2^4).

Indeks netralisasi untuk vaksin V-M, V-S dan V-C yang menunjukkan bahwa bila paparan lapang dengan virus asal Legok 2004 maka kelompok ayam yang mendapatkan masing-masing vaksin V-M, V-S, dan V-C akan mampu menahan infeksi. Hal ini ditunjukkan bahwa hasil indeks netralisasi $>1.50-1.90$, sehingga bersifat protektif. Sedangkan vaksinasi dengan V-V ternyata mampu menahan paparan lapang virus Legok 2004.

Dari keseluruhan hasil dapat dikatakan bahwa penggunaan vaksin V-M, V-S, V-V, dan V-C hanya dapat digunakan pada daerah yang paparan lapang adalah virus Legok 2004 dan Nagrak 2009. Meski hanya pada daerah yang menggunakan vaksin V-V tidak dapat menahan paparan lapang virus Legok 2004. Sedangkan untuk daerah dengan paparan lapang virus Lawang 2010 maka vaksinasi dengan vaksin V-M, V-S, V-V, dan V-C tidak menimbulkan kekebalan yang protektif.

Dari hasil penelitian ini maka dapat dijelaskan bahwa melakukan uji hemaglutinasi untuk mengetahui titer antibodi atau kekebalan tubuh setelah divaksinasi maka uji tersebut hanya dapat menggunakan antigen uji HA tertentu sesuai dengan paparan virus lapang sesuai dengan daerahnya. Seperti penggunaan vaksinasi V-M, V-S, V-V, dan V-C dapat menghasilkan kekebalan protektif bagi ayam

Tabel 7 Hasil uji Netralisasi dengan antigen Nagrak 2009

50% <i>endpoint neutralization index</i>	Indeks Netralisasi = (50% <i>endpoint neutralization index</i> . Serum normal – Serum sampel)
Serum normal $10^{6.0}$	
Serum terhadap:	
V-M = $10^{2.55}$	V- M = $6,00 - 2,55 = 3,45$
V-S = $10^{2.50}$	V- S = $6,00 - 2,50 = 3,50$
V-V = $10^{2.75}$	V-V = $6,00 - 2,75 = 3,25$
V-C = $10^{3.50}$	V-C = $6,00 - 3,50 = 2,50$

Tabel 8 Hasil uji Netralisasi dengan antigen Legok 2004

50 % <i>endpoint neutralization index</i>	Indeks Netralisasi = (50 % <i>endpoint neutralization index</i> . Serum normal–Serum sampel)
Serum Normal = $10^{9.0}$	
Serum terhadap:	
V-M = $10^{6.75}$	V- M = $9,00-6,75 = 2,25$
V-S = $10^{6.50}$	V- S = $9,00-6,50 = 2,50$
V-V = $10^{8.00}$	V-V = $9,00-8,0 = 1,00$
V-C = $10^{7.00}$	V-C = $9,00-7,00 = 2,00$

bila didaerah peternakan ayam tsb mendapat paparan lapang virus Legok 2004 dan Nagrak 2009 dan tidak ada kekebalan tubuh ayam setelah divaksinasi dengan V-M, V-S, V-V, dan V-C bila mendapat serangan virus lapang Lawang 2010. Sehingga dapat dikatakan bahwa vaksinasi dengan H5N1 harus menggunakan vaksin yang sesuai dengan virus lapang. Selain itu vaksinasi terhadap virus AI H5N1 dengan vaksin komersial disarankan terutama untuk ayam petelur yang mendapatkan vaksinasi minimal ulangan senyak 3 kali akan menghasilkan titer Ab yang cukup protektif dengan paparan lapang virus Legok 2004, Nagrak 2009 dan Lawang 2010.

KESIMPULAN

Antigen virus AI subtype H5N1 yang representatif digunakan pada uji HI adalah antigen Legok 2004 dibandingkan antigen Nagrak 2009 dan antigen Lawang 2010 dan antigen Pusvetma 2010.

Titer antibodi minimal yang dapat menahan virus AI H5N1 isolat lapang menggunakan uji serum netralisasi adalah 2^8 .

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terimakasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, IPB yang telah membantu pendanaan penelitian ini dan PT. IPB Shigeta–Animal Phamaceutical yang memfasilitasi antigen Legok 2004 dan Lawang 2010.

DAFTAR PUSTAKA

- Capua I, Marangon S. 2007. Control and prevention of avian influenza in an evolving scenario. *Vaccine* 25:5645-5652.
- [DITJENNAK] Direktorat Jendral Peternakan. 2007. *Farmakope Obat Hewan Indonesia*. Jilid I (Sediaan Biologik). Ed ke-3. Jakarta: Direktorat Jenderal Peternakan Departemen Pertanian RI.
- [DITJENNAK] Direktorat Jendral Peternakan. 2008. *Prosedur Operasional Standar Pengendalian Penyakit Avian Influenza*. Jakarta: Direktorat Jenderal Peternakan Departemen Pertanian.
- [DITJENNAK] Direktorat Jendral Peternakan. 2009. Rekomendasi kebijakan vaksin dan strategi

- vaksinasi AI. Jakarta: Direktorat Jenderal Peternakan Departemen Pertanian.
- Maas R, Tacken M, Zoelen D, Oie H. 2007. Dose response effects of Avian Influenza (H7N7) vaccination of chickens: serology, clinical protection and reduction of virus excretion. *Vaccine* 27:3592-3597.
- Nugroho E, RD Soejoedono, T.Purnawarman, C.Basri, P Hermans, AT Muljono, AJ Neil. 2010. Antibody responses to Avian Influenzae vaccination in Broiler chickens in Indonesia. 2010. Proceeding The first Conggres of SEAVSA
- [OIE] Office International des Epizooties. 2004. OIE Manual of Standard for Diagnostic Test and Vaccines. Ed ke-4. Paris: OIE.
- [OIE] Office International des Epizooties. 2005. Avian Influenza. Chapter 2.7.12. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. Paris: OIE.
- ON Putri, A Bouman, I Claassen, G Koch, **R.D Soejoedono**, JA Stegeman, M Van Boven. 2011. A single vaccination of commercial broilers does not reduce trasmission of H5N1 HPAI. *Veterinary Research*, 42:74 (IF: 3,765)
- Susanti R, Soejoedono RD, Mahardika IGNK, Wibawan IWT, Suhartono MT. 2008. Filogenetik dan struktur antigenik virus Avian Influenza sub tipe H5N1 isolat unggas air. *J Vet* 9: 99-106.
- [WHO] World Health Organization. 2002. WHO Manual on Animal Influenza. Diagnosis and Surveillance. Geneva: WHO.
- Wibawan I.W.T, Karuni N K, 2010. Preparasi dan Aplikasi Vaksin Polivalen Avian Influenza H5N1 pada Unggas Menggunakan Prinsip Antibodi Anti-Idiotipe : Efikasi Vaksin terhadap Berbagai Strain Virus AI H5N1 di Indonesia.